

# Handbok (Bruksanvisning) till QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit



50

Version 2



För in vitro-diagnostisk användning



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland



R1 1127632SV

# Innehåll

Avsedd användning .....	4
Avsedd användare .....	4
Beskrivning och princip .....	5
Provvolymer .....	5
Lyseringsprov .....	7
Adsorption av QIAamp Mini-kolonnmembranet .....	7
Avlägsnande av restkontaminanter .....	7
Eluering av rena nukleinsyror .....	8
Utbyte och storlek på nukleinsyror .....	8
Beskrivning av protokoll .....	9
Sammanfattning och förklaring .....	9
Material som medföljer .....	10
Kitinnehåll .....	10
Paketets innehåll .....	11
Material Som Behövs Men Inte Medföljer .....	12
Ytterligare reagenser .....	12
Förbrukningsartiklar .....	12
Utrustning .....	13
Varningar och försiktighet .....	14
Säkerhetsinformation .....	14
Vid nödsituationer .....	15
Försiktighetsåtgärder .....	15

Bortskaffning.....	16
Förvaring och hantering av reagenser.....	17
Användningsstabilitet.....	17
Förvaring och hantering av prover.....	18
Förfarande.....	19
Förberedning av buffertar och reagenser.....	26
Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma.....	29
Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1-5 ml humanblodplasma.....	34
Kvalitetskontroll.....	39
Begränsningar.....	39
Prestandaegenskaper.....	40
Referenser.....	41
Felsökningshandbok.....	42
Symboler.....	45
Bilaga A: Rekommendation för separation och förvaring av blodplasma.....	48
Bilaga B: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering.....	50
Beställningsinformation.....	51
Dokumentrevisioner.....	52

## Avsedd användning

QIAamp DSP Circulating NA Kit är ett system som använder kiselmembranteknik (QIAamp-teknik) för manuell isolering och rening av cirkulerande cellfritt DNA och RNA från plasmaprover av humant blod.

QIAamp DSP Circulating NA Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

## Avsedd användare

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, såsom tekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska metoder.

# Beskrivning och princip

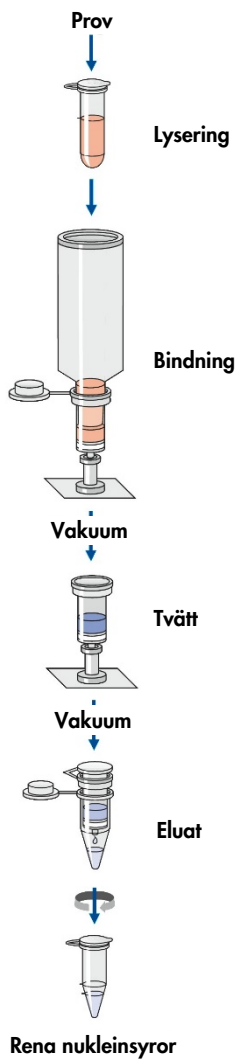
QIAamp DSP Circulating NA-proceduren består av 4 steg (lysering, bindning, tvätt och eluering) och utförs med QIAamp Mini-kolonner på QIAvac-systemet. Den robusta proceduren bidrar till att minska korskontamination mellan prover och öka användarsäkerheten vid hantering av potentiellt smittsamma prover.

Denna enkla procedur är lämplig för samtidig bearbetning av upp till 24 prover på mindre än 2 timmar.

## Provvolymer

QIAamp Mini-kolonner binder fragmenterade nukleinsyror som är så korta som 20 nt, men utbytet beror på provvolymen och koncentrationen av cirkulerande nukleinsyror i provet (vanligtvis 1–100 ng/ml i plasma). QIAamp DSP Circulating NA-proceduren har optimerats för provvolymen på upp till 5 ml.

Procedur för QIAamp DSP  
Circulating NA Kit



Figur 1. Översikt över proceduren för QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## Lyseringsprov

Fritt cirkulerande nukleinsyror i biologiska vätskor binds vanligtvis till protein eller kapslas in i blåsor, vilket kräver ett effektivt lyseringssteg så nukleinsyror frigörs för selektivt bindning till QIAamp Mini-kolonnen. Därför lyseras prover under högdenaturerande förhållanden vid förhöjda temperaturer tillsammans med proteinas K och Buffer ACL, vilket säkerställer inaktiveringen av DNaser och RNaser samt frigör nukleinsyror från bundna proteiner, fetter och vesiklar.

## Adsorption av QIAamp Mini-kolonmembranet

För att tillåta optimal bindning av de cirkulerande nukleinsyror till membranet justeras bindningsförutsättningarna genom att Buffer ACB tillsätts till lysatet. Lysatet överförs därefter till en QIAamp Mini-kolonn och cirkulerande nukleinsyror adsorberas från en stor volym till kiseldioxidmembranet när lysatet dras igenom detta med hjälp av vakuumtryck. Salt- och pH-förhållandena säkerställer att majoriteten av protein och andra kontaminanter som kan försämra PCR och andra enzymatiska nedströmsreaktioner inte fastnar på QIAamp Mini-kolonmembranet.

Ett vakuimgrenrör (t.ex. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) och en vakuumpump som kan skapa ett vakuum på ~800-900 mbar (t.ex. QIAGEN® Vacuum Pump) krävs för detta protokoll. En Vacuum Regulator bör användas (del av QIAvac Connecting System) för enkel övervakning av vakuumtrycket och ett lämpligt vakuumutsläpp.

## Avlägsnande av restkontaminanter

Nukleinsyror förblir bundna till membranet medan kontaminanterna effektivt tvättas bort under 3 tvättsteg.

## Eluering av rena nukleinsyror

Eluering sker med användning av Buffer AVE. I ett och samma steg elueras högrenade nukleinsyror i Buffer AVE som balanserats efter rumstemperatur. En flexibel eluering volym på 50–150 µl kan tillämpas. Om högre koncentrationer av nukleinsyror krävs kan eluering volymen minskas ner till 20 µl. Eluering volymer under 50 µl leder till mer koncentrerade eluerare av nukleinsyror, men kan leda till lägre totalt utbyte.

Den erhållna eluarvolymen kan vara upp till 5 µl mindre än den volym eluering buffert som tillsattes till kolonnen.

## Utbyte och storlek på nukleinsyror

Utbytet av fritt cirkulerande nukleinsyror som isoleras från biologiska prover är vanligtvis lägre än 1 µg och är därför svårt att bestämma med en spektrofotometer. Det totala utbytet cirkulerande DNA och RNA som kan erhållas från ett prov med QIAamp DSP Circulating NA Kit varierar mellan prover från olika individer och beror också på andra faktorer (t.ex. vissa sjukdomstillstånd). Dessutom är det sannolikt att förekomsten av bärar-RNA i de utvunna nukleinsyrorerna dominerar UV-absorptionsresultaten (se sidan 27). Kvantitativa amplifiering-metoder rekommenderas för att fastställa utbytet.

Storleksdistributionen av cirkulerande nukleinsyror som renas med QIAamp DSP Circulating NA Kit kan kontrolleras med agar gelelektrofores eller hybridisering till ett målspecifikt uppmärkt sökfragment (1) eller en mikrofluidisk elektroforeslösning (t.ex. Agilent® Bioanalyser).



## Beskrivning av protokoll

Två olika protokoll tillhandahålls i denna handbok.

- Denna "Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma" (sida 29) används för att bearbeta upp till 5 ml plasma i steg om 1 ml och har optimerats för minimal manuell insats och kort omsättningstid.
- Denna "Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1-5 ml humanblodplasma" (sida 34) används för bearbetning av upp till 5 ml plasma i steg om 1 ml och utgör ett oförändrat protokoll för *QIAamp DSP Circulating NA Kit-Handbok* version 1, revision 3 (R3).

## Sammanfattning och förklaring

Fritt cirkulerande nukleinsyror förekommer vanligtvis i humanplasma som korta fragment, < 1000 bp (DNA), < 1000 nt (RNA), eller så små som 20 nt (miRNA:er). Koncentrationen av fritt cirkulerande nukleinsyror i human blodplasma är vanligtvis låg och varierar avsevärt mellan individer i intervallet 1–100 ng / ml i human-prover (2–6).

QIAamp DSP Circulating NA Kit möjliggör effektiv rening av cirkulerande nukleinsyror från humanplasma. Proverna kan vara antingen frysta eller färska. Extension Tubes (Förlängningsrör) och vakuumbearbetning på QIAvac 24 Plus möjliggör startprov-volymer på upp till 5 ml och flexibla elueringsvolymer mellan 20 och 150 µl, vilket möjliggör koncentrationer av nukleinsyraarter som förekommer i låga koncentrationer.

Eluerat fritt genomiskt DNA eller RNA är redo för användning i nedströmstillämpningar eller för förvaring. Användarna bör optimera plasmainmatningen och elueringsvolym för sina specifika mål och nedströmsapplikationer i sina laboratorier.

# Material som medföljer

## Kitinnehåll

<b>QIAamp DSP Circulating NA Kit</b>	<b>(50)</b>
<b>Katalognr.</b>	<b>61504</b>
<b>Antal beredningar</b>	<b>50</b>

	Identitet	Symboler	Kvantitet
QIAamp Mini	QIAamp Mini-kolonner med tvättrör (WT, Wash Tubes) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (Kolonnförlängare) (20 ml)	<b>COL</b> <b>EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)	<b>WASH</b> <b>TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)	<b>ELU</b> <b>TUBE</b>	50
VC	VacConnectors (Vakuumslutningar)	<b>VAC</b> <b>CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer* (Lyseringsbuffert)	<b>LYS</b> <b>BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (Bindningsbuffert) (koncentrat)	<b>BIND</b> <b>BUF</b> <b>CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Tvättbuffert 1) (koncentrat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>1</b> <b>CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Tvättbuffert 2) (koncentrat)	<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>2</b> <b>CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Elueringsbuffert) (lila lock)	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinas K)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Bärare	Carrier-RNA (Bärrar-RNA) (röda lock)	<b>CAR</b> <b>RNA</b>	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini-kolonner med tvättrör (WT, Wash Tubes) (2 ml)	<b>COL</b>	50
	Handbok	<b>H</b> <b>B</b>	1

\* Innehåller kaotopiskt salt. Sidan 14 innehåller Varningar och försiktighet.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

## Paketets innehåll

De viktigaste komponenterna i satsen förklaras nedan.

**Tabell 1. Aktiva beståndsdelar i levererad reagens**

Reagens		Aktiv beståndsdel	Koncentration
Symbol	Namn		
ACL	Lysis Buffer (Lyseringsbuffert)	Guanidintiocyanat	≥ 30 till < 50 % w/w
ACB	Binding Buffer (Bindningsbuffert) (koncentrat)	Guanidintiocyanat	≥ 30 till < 50 % w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (Tvättbuffert 1) (koncentrat)	Guanidinhydroklorid	≥ 30 till < 60 % w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (Tvättbuffert 2) (koncentrat)	Ingen	–
AVE	Elution Buffer (Elueringsbuffert) (lila lock)	Ingen	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinas K)	Proteinas K	≥ 1 till < 3 % w/w
Bärare	Carrier-RNA (Bärar-RNA) (röda lock)	Ingen	–

## Kontroller och kalibratorer

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat som genereras efter isolering av nukleinsyra, måste lämpliga kontroller för nedströms applikationer användas.

# Material Som Behövs Men Inte Medföljer

## Ytterligare reagenser

- Etanol (96-100 %)\*
- Isopropanol (100 %)
- Krossad is (endast för "Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma").
- Vissa prover kan kräva spädning med fosfatbuffrad saltlösning (PBS)

## Förbrukningsartiklar

- Pipetter (justerbara)
- Sterila pipettspetsar (pipettspetsar med aerosolbarriärer rekommenderas för att förebygga korskontamination)
- 1,5 till 2 ml nukleasfria mikrorör
- 50 ml centrifugrör

\* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.

## Utrustning

- Vattenbad eller värmeblock med kapacitet för 50 ml-centrifugrör vid 56 °C eller 60 °C \*
- Värmeblock eller liknande vid 56 °C med kapacitet att innehålla 2 ml tvättrör (endast för ett klassiskt protokoll)\*
- Virvelblandare
- Mikrocentrifug (med rotor för 2 ml rör)\*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (Kat.nr: 19413)
- QIavac Connecting System (Kat.nr: 19419) eller motsvarande
- Vacuum Pump (Kat.nr: 84010 [USA och Kanada], 84000 [Japan] eller 84020 [övriga världen]) eller motsvarande pump som kan skapa ett vakuum på -800 till -900 mbar
- Valfritt: VacValves (Kat.nr: 19408)

\* Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

# Varningar och försiktighet

Var medveten om att du kan behöva konsultera lokala regelverk för rapportering av allvariga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

För in vitro-diagnostisk användning

## Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). Dessa är tillgängliga på webben i behändiga PDF-format på adressen [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), där du kan hitta, visa och skriva ut SDS (säkerhetsdatablad) för varje QIAGEN-sats och satskomponent.

**VARNING** Risk för personskada



Tillsätt **ALDRIG** blekmedel eller sura lösningar direkt till avfall från provberedning.

Buffer ACL, Buffer ACB och Buffer ACW1 innehåller guanidinsalter, vilka kan bilda starkt reaktiva sammansättningar i kombination med blekmedel.

Om vätska med dessa buffertar spills ut ska rengöring utföras med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittsamma ämnen ska området först rengöras med laboratorierengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit.

- Prover är potentiellt smittsamma. Kassera analys- och provavfall i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

## Vid nödsituationer

CHEMTREC

USA & Kanada 1-800-424-9300

Utanför USA & Canada +1703-527-3887

## Försiktighetsåtgärder

Följande risk- och skyddsmeddelanden gäller för komponenterna i QIAamp DSP Circulating NA Kit.

### Buffer ACB



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

### Buffer ACL



Innehåller: guanidinisotiocyanat. Fara! Farligt vid förtäring. Kan vara skadligt vid hudkontakt eller inandning. Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt att göra. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.

### Buffer ACW1



Innehåller guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

## Proteinas K



Innehåller: Proteinas K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm / rök / gaser / dimma / ångor / sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

## Bortskaffning

Avfallet innehåller prover och reagenser. Detta avfall kan innehålla giftigt och smittsamt material och måste kasseras på lämpligt sätt. Se dina lokala säkerhetsföreskrifter för lämpliga kasseringsprocedurer.

Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). Dessa är tillgängliga online i PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) där du kan hitta, granska och skriva ut SDS (säkerhetsdatablad) för alla kit och kit-komponenter från QIAGEN.



# Förvaring och hantering av reagenser

QIAamp Mini-kolonner ska förvaras torrt i 2–8 °C. Alla buffertar ska förvaras i rumstemperatur (15–25 °C). QIAamp Mini-kolonner och -buffertar kan förvaras under dessa förutsättningar fram till förpackningens utgångsdatum utan försämrad funktion.

Frystorkat bärar-RNA kan förvaras i rumstemperatur (15-25 °C) fram till det utgångsdatum som står angivet på komponentens etikett. Bärar-RNA ska lösas i Buffer AVE. Upplöst bärar-RNA bör tillsättas omedelbart till Buffer ACL enligt beskrivningen på sidan 30 för ett Breeze-protokoll och på sidan 35 för ett klassiskt protokoll. Denna lösning ska tillredas färsk. Oanvända delar av bärar-RNA upplöst i Buffer AVE ska frysas i delmängder mellan -30 °C till -15 °C.

QIAamp DSP Circulating NA Kit innehåller proteinas K-lösning som är redo för användning och som löses upp i en särskilt formulerad förvarings-buffert. Protein K är stabilt fram till utgångsdatumet på komponentetiketten när det förvaras i rumstemperatur (15–25 °C).

## Användningsstabilitet

Kitet kan användas i 12 månader efter första användningen eller till utgångsdatum, vilket som inträffar först.

# Förvaring och hantering av prover

## Förvaring och hantering av blod

För att undvika nedbrytning av cellfria nukleinsyror och att cellnukleinsyror frigörs, rekommenderar vi att helblod förvaras i högst 6 timmar vid 2-8 °C (t.ex. EDTA-prover). Om du använder stabiliserade blodprovtagningsrör bör du följa tillverkarens förvaringsvillkor. Vi rekommenderar att du validerar dessa förvaringsvillkor tillsammans med din specifika nedströmstillämpning och mål.

## Förvaring och hantering av plasma

Vi rekommenderar att separationen av plasma och isoleringen av nukleinsyror utförs omedelbart efter bloddonationen när du använder EDTA som antikoagulant, särskilt för RNA. Vid kort förvaring kan plasma lagras i upp till 24 timmar i 2-8 °C.

För längre förvaring kan plasma-delmängder från såväl stabiliserade som icke-stabiliserade provtagningsrör för blod förvaras i -20 °C eller -80 °C i upp till 12 månader (endast för DNA som mål) eller vid -80 °C i 4 veckor (RNA som mål).

## Förvaring av eluerade nukleinsyror

Eluerade nukleinsyror samlas upp i 1,5 ml elueringsrör (medföljer). De reade cirkulerande nukleinsyror kan lagras i upp till 24 timmar i 2-8 °C. För längre förvaring än 24 timmar rekommenderas förvaring i -30 °C till -15 °C för DNA och -90 °C till -60 °C för RNA-nedströmstillämpningar.

# Förfarande

Viktigt att tänka på före start

## QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus har utformats för snabb och effektiv vakuumbearbetning av upp till 24 parallella QIAGEN-spinnkolonner. Prov- och tvättlösningar hämtas genom kolonnmembranen med hjälp av vakuumbesugningen för centrifugering, vilket ökar hastigheten och minskar operatörens arbete med reningsprocedurerna.

Tillsammans med QIAvac Connecting System kan QIAvac 24 Plus användas som ett genomflödningsystem. Provfiltratet samlas upp i en separat avfallsflaska.

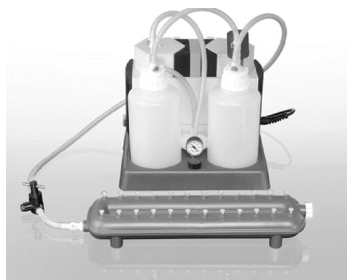
Se hanteringsriktlinjerna i *handbok för QIAvac 24 Plus* för information om underhåll av QIAvac 24 Plus.

## Bearbeta QIAamp Mini-kolonner i QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini-kolonner bearbetas i QIAvac 24 Plus med VAcConnectors för engångsbruk och VacValves för flergångsbruk. VacValves (tillval) sätts in direkt i QIAvac 24 Plus-grenrörets luerfack, vilket ger en stadig flödes hastighet som möjliggör parallellbearbetning av olika provolymer. De bör användas för att säkerställa ett konsekvent vakuumbesugningen om provens flödes hastigheter avviker avsevärt från varandra. VAcConnectors är engångskopplingar som passar mellan QIAamp Mini-kolonner och VacValves eller mellan QIAamp Mini-kolonner och luerfacken på QIAvac 24 Plus. De förhindrar direkt kontakt mellan spinnkolonnen och VacValve under reningen, vilket förebygger korskontamination mellan proverna. VAcConnectors kasseras efter en användning. På grund av de stora lösningsolymer som används krävs ett QIAvac Connecting System (eller en liknande lösning med avfallsflaskor) (se Figur 2).

## Hanteringsriktlinjer för QIAvac 24 Plus

- Ställ alltid QIAvac 24 Plus på en säker bänk- eller arbetsyta. Om du tappar QIAvac 24 Plus kan grenröret spricka.
- QIAvac 24 Plus ska alltid förvaras rent och torrt. För rengöringsförfaranden, hänvisas till *QIAvac 24 Plus* handbok.
- Komponenterna i QIAvac 24 Plus tål inte vissa lösningsmedel (Tabell 2). Om dessa lösningsmedel spills på enheten ska den sköljas noggrant med vatten.
- För att säkerställa en konsekvent prestanda, använd inte kisel- eller vakuumsfett på någon del av QIAvac 24 Plus manifold (grenröret).
- Var alltid försiktig och använd skyddsglasögon när du arbetar nära ett vakuumsgrenrör med tryck.
- Kontakta QIAGEN:s tekniska service eller din lokala återförsäljare för information om reservdelar.
- Vakuums tryck är tryckskillnaden mellan insidan av vakuumsgrenröret och atmosfären (standardatmosfärstryck 1013 millibar eller 760 mm Hg) och kan mätas upp med QIAvac Connecting System (se Figur 2). Ett protokoll kräver en vakuumpump som kan skapa ett vakuum på -800 till -900 mbar (t.ex. QIAGEN Vacuum Pump). Undvik högre vakuums tryck. Lägre vakuums tryck än det som rekommenderas kan minska utbytet av och renheten hos nukleinsyrorerna och ökar risken för blockerade membran.



Figur 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System och Vacuum Pump.

Tabell 2. Kemiska resistensegenskaper för QIAvac 24 Plus

Resistent mot		Ej resistent mot
Ättiksyra	Kaotropiska salter	Bensen
Kromsyra	Koncentrerade alkoholer	Fenol
SDS	Natriumklorid	Kloroform
Tween™ 20	Karbamid	Toluen
Klorblekning	Saltsyra	Etrar
Natriumhydroxid		

## Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Anslut QIAvac 24 Plus till en vakuumkälla. Om du använder QIAvac Connecting System ska du ansluta systemet till grenröret och vakuumkällan enligt beskrivningen i bilaga A i denna handbok för QIAvac 24 Plus.
2. För in en VacValve (Vac-ventil, tillval) i varje lueröppning på QIAvac 24 Plus som ska användas (se Figur 3). Stäng de luerfack som inte används med luerlock eller stäng infogad VacValve.  
För att säkerställa ett konsekvent vakuum bör VacValves användas om provernas flödes hastigheter avviker avsevärt från varandra.
3. Sätt in en VacConnector i varje VacValve (se Figur 3).  
Utför detta steg precis innan du påbörjar reningen för att undvika att VacConnectors exponeras för eventuella luftföroreningar.
4. Placera QIAamp Mini-kolonnerna i de VacConnectors som finns på grenröret (se Figur 3).  
**Obs!** Spara tvättröret från blisterförpackningen för användning i ett protokoll för rening.
5. Sätt in en kolonnförlängare (20 ml) i varje QIAamp Mini-kolonn (se Figur 3).  
**Obs!** Se till att kolonnförlängaren är ordentligt insatt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.
6. För rening av nukleinsyror, följ anvisningarna i detta protokoll. Kassera VacConnectors på lämpligt vis efter användning.

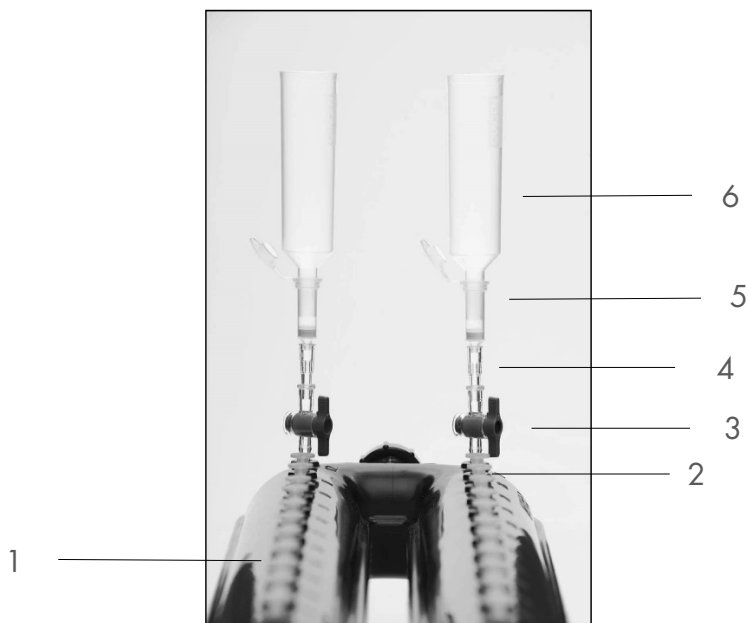
Lämna locket på QIAamp Mini-kolonnen öppet medan vakuum appliceras.

Stäng av vakuomet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under bearbetningen. En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare (ingår i QIAvac Connecting System).

**Obs!** Varje VacValve kan stängas individuellt när provet har hämtats helt genom spinnkolonnen, vilket möjliggör parallellbearbetning av prover med olika volym eller viskositet.

7. När proverna har bearbetats rengör du QIAvac 24 Plus (se "Rengöring och dekontaminerande av QIAvac 24 Plus" i *handbok för QIAvac 24 Plus*).

**Obs!** Buffer ACL, ACB och ACW1 är inte kompatibla med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Sidan 14 innehåller Varningar och försiktighet.

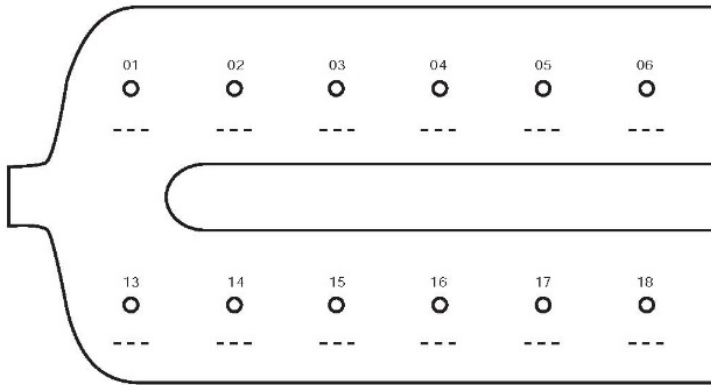


Figur 3. Konfigurera QIAvac 24 Plus med QIAamp Mini-kolonner med VacValves, VacConnectors och kolonnförlängare.

- |          |  |          |                    |
|----------|--|----------|--------------------|
| <b>1</b> | QIAvac 24 Plus vacuum manifold                   | <b>4</b> | VacConnector       |
| <b>2</b> | Luerfack på QIAvac 24 Plus (stängs med luerlock) | <b>5</b> | QIAamp Mini-kolonn |
| <b>3</b> | VacValve*  | <b>6</b> | Kolonnförlängare   |

Vi rekommenderar märkning av provrören och QIAamp Mini-kolonnerna för användning med QIAvac 24 Plus- vakuumsystem i enlighet med schemat i Figur 4 för att undvika förväxling av proverna. Detta schema kan fotokopieras och märkas med provnamn.

\*Måste köpas separat.

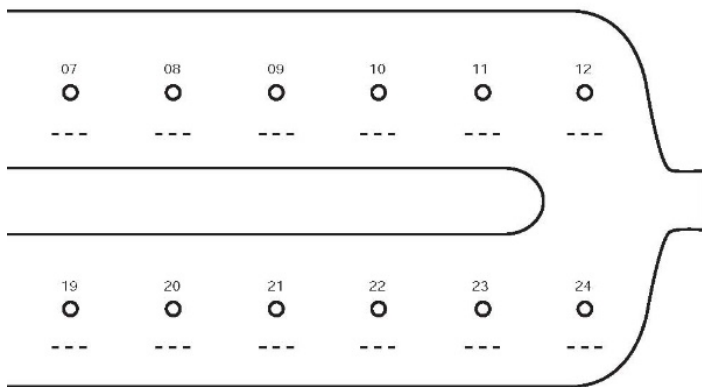


Datum: \_\_\_\_\_

Operatör: \_\_\_\_\_

Körnings-ID: \_\_\_\_\_





Figur 4. Märkningsschema för provrör och QIAamp Mini-kolonner för användning med vakuumsystemet QIAvac 24 Plus.

# Förberedning av buffertar och reagenser

## Buffer ACB

Tillsätt 200 ml isopropanol (100 %) till 300 ml Buffer ACB-koncentrat inför användning. Detta ger 500 ml Buffer ACB. Blanda noggrant efter att isopropanol har tillsatts.

## Buffer ACW1 \*

Tillsätt 25 ml etanol (96–100 %) till 19 ml Buffer ACW1-koncentrat inför användning. Detta ger 44 ml Buffer ACW1. Blanda noggrant efter att etanol har tillsatts.

## Buffer ACW2 †

Tillsätt 30 ml etanol (96–100 %) till 13 ml Buffer ACW2-koncentrat inför användning. Detta ger 43 ml Buffer ACW2. Blanda noggrant efter att etanol har tillsatts.

## Tillsätta bärar-RNA till Buffer ACL\*

Bärar RNA har 2 syften. För det första förbättrar det bindningen av nukleinsyror till QIAamp Mini-membranet, särskilt om det är mycket få målmolekyler i provet. För det andra minskar tillsatsen av stora mängder bärar-RNA risken för RNA-nedbrytning i den sällsynta händelsen att RNase-molekylerna undgår denaturering genom de kaotropiska salterna och rengöringsmedlen i Buffer ACL.

\* Innehåller kaotropiskt salt. Sidan 14 innehåller Warnings and Precautions.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

Mängden frystorkat bärar-RNA är tillräckligt för den volym Buffer ACL som medföljer kitet. Den rekommenderade koncentrationen av bärar-RNA har anpassats så att ett QIAamp DSP Circulating NA-protokoll kan användas som ett generiskt system för rening kompatibelt med många olika amplifiering-system och är lämplig för ett stort urval RNA- och DNA-mål.

Olika amplifiering-system har varierande effektivitet beroende på den totala mängden nukleinsyror som förekommer i reaktionen. Eluat från denna sats innehåller både cirkulerande nukleinsyror och bärar-RNA, och mängden bärar-RNA överstiger vida mängden cirkulerande nukleinsyror i de flesta fall. Därför kommer kvantifiering av isolerade cirkulerande nukleinsyror genom UV-absorbansläsning inte vara tillräcklig, eftersom resultaten från sådana mätningar avgörs av förekomsten av bärar-RNA.

För att erhålla högsta nivå av känslighet på amplifiering-reaktionerna kan det vara nödvändigt att minska mängden bärar-RNA som tillsätts till Buffer ACL.

För amplifiering-system som inbegriper oligo dT-primers får bärar-RNA inte tillsättas under isoleringen av fritt cirkulerande nukleinsyror.

Tillsätt 1550 µl Buffer AVE\* till röret som innehåller 310 µg frystorkat bärar-RNA för att erhålla en lösning med koncentrationen 0,2 µg/µl. Lös upp bärar-RNA grundligt, dela upp det i lämpliga delmängder med lämplig storlek och förvara det i -30 °C till -15 °C. Undvik ett upprepat frystande och tinande av delmängderna med bärar-RNA.

Det går inte att lösa upp bärar-RNA i Buffer ACL. Det måste först lösas upp i Buffer AVE och därefter tillsättas till Buffer ACL.

Beräkna hur stor volym Buffer ACL-bärar-RNA-blandning som behövs per provsats enligt tabellerna i protokollen. Välj antalet prover som ska bearbetas samtidigt.

\*Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

Blanda försiktigt genom att vända röret eller flaskan 10 gånger. För att undvika skumbildning, vortexblanda inte.

**Obs!** Proceduren för provberedning är optimerad för max. 1,0 µg bärar-RNA per prov. Om mindre bärar-RNA har visat sig vara bättre för ditt amplifiering-system ska endast erforderlig mängd upplöst bärar-RNA överföras till provrören med Buffer ACL. För varje mikrogram bärar-RNA som krävs per beredning ska 5 µl upplöst bärar-RNA tillsättas till Buffer ACL. (Användning av mindre än 1,0 µg bärar-RNA per prov kan vara lämpligt och måste valideras för varje specifik provtyp och nedströms analys.)

# Breeze-protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma

Detta protokoll är avsett för rening av cirkulerande DNA och RNA från 1–5 ml humanblodplasma och har optimerats för minimal arbetsinsats och kort bearbetningstid. Se "Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1-5 ml humanblodplasma" (sidan 34) för befintliga användarvaliderade arbetsflöden som använder version 1/R3 av QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## Viktigt att tänka på före start

- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Stäng av vakuemet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under protokollstegen.  
**Obs!** Vacuum Pump-trycket bör vara mellan -800 och -900 mbar.
- Balansera proverna efter rumstemperatur.
- Använd fosfatbuffrad saltlösning (PBS) till provets volym är lika med den närmaste exakta volymen (1 till 5 ml).
- Ställ in QIAvac 24 Plus enligt beskrivningen på sidan 21.
- Värm ett vattenbad eller ett värmeblock till 56 °C för användning med 50 ml centrifugrör i steg 3.
- Balansera QIAamp Mini-spinnkolonnerna efter rumstemperatur i minst 1 timme före användning.
- Kontrollera att Buffer ACB, Buffer ACW1 och Buffer ACW2 har förberetts (tillsättning av isopropanol eller etanol) enligt anvisningarna på sidan 26.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerad i Buffer AVE till Buffer ACL i enlighet med anvisningarna i Tabell 3.

**Tabell 3. Volym Buffer ACL och bärar-RNA (löst i Buffer AVE) som krävs för bearbetning av 1–5 ml plasmaprover av humanblod**

Konfiguration för ml plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Number of samples (Antal prover)	Buffer ACL (ml)					Bärar-RNA i Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Förfarande: Breeze-protokoll

1. Pipettera QIAGEN Proteinase K, plasma och Buffer ACL **i den ordningen** i ett 50 ml centrifugrör (medföljer ej).

Konfiguration	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Stäng locket och blanda genom pulsirvel-blandning i 5 x 2 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa en effektiv lysering är det viktigt att provet och Buffer ACL blandas noga för att få fram en homogen lösning.

**Obs!** Stör inte proceduren under den här tiden. Fortsätt omedelbart vidare till steg 3 för att starta lyseringsinkubationen.

3. Inkubera vid 56 °C ( $\pm$  1 °C) i 15 ( $\pm$  1) minuter.
4. Sätt tillbaka provröret på arbetsbänken och skruva loss korken.
5. Tillsätt Buffer ACB till lysatet i provröret. Välj volym enligt konfigurationen i steg 1.

Konfiguration	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Stäng locket och använd en noggrann pulsirvel-blandning i 5 x 2 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att lysat och Buffer ACB blandas noga för att få fram en homogen lösning.

7. Inkubera lysat-Buffer ACB-blandningen i provröret i 5 ( $\pm$  1) minuter i rumstemperatur.

8. Sätt in QIAamp Mini-kolonnerna i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold", sidan 21). Sätt in en 20 ml kolonnförlängare i den öppna QIAamp Mini-kolonnen.

Se till att kolonnförlängaren sitter stadigt insatt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.

**Obs!** Spara tvättröret för torkcentrifugeringen i steg 13.

9. Applicera försiktigt lysatet från steg 7 i kolonnförlängaren på QIAamp Mini-kolonnen. Sätt igång vakuumpumpen. När alla lysat har hämtats fullständigt genom kolonnerna stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar. Ta försiktigt bort kolonnförlängaren och kassera den.

Obs! Notera att stora provvolymerna av lysat (omkring 18 ml när du börjar med ett 5 ml prov) kan behöva upp till 20 minuter för att passera genom QIAamp Mini-membranet med hjälp av vakuumkraft.

En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare och enklare (ingår i QIAvac Connecting System).

**Obs!** För att undvika korskontamination ska du undvika att korsangränsa QIAamp Mini-kolonner medan kolonnförlängare avlägsnas.

10. Tillsätt 600 µl Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW1 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
11. Tillsätt 750 µl Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW2 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
12. Tillsätt 750 µl etanol (96–100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all etanol har hämtats fullständigt genom spinnkolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
13. Stäng locket på QIAamp Mini-kolonnen. Ta bort den från vakuumgrenröret och kassera VacConnector. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (från steg 8) och centrifugera med full hastighet (20 000 × g; 14 000 v/min) i 3 (± 0,5) minuter.



14. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör. Öppna locket och inkubera allt i rumstemperatur i 3 minuter till att membranet är helt torrt.

15. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 1,5 ml rör för eluering (medföljer) och kassera 2 ml-tvättröret från steg 14. Tillsätt 20–150 µl Buffer AVE mitt på QIAamp Mini-kolonnmembranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur i 3 (± 0.5) minuter.

**Viktigt:** Se till att Buffer AVE (elueringsbufferten) balanseras efter rumstemperatur (15–25 °C). Om elueringen görs i små volymer (<50 µl) måste elueringsbufferten dispensereras mitt på membranet för fullständig eluering av bundna nukleinsyror.

Elueringsvolymen är flexibel och kan anpassas efter kraven för nedströmstillämpningar.

Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till ett lägre totalt utbyte.

Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5 µl mindre än elueringsvolymen som tillsattes på membranet i QIAamp Mini-kolonnen.

**Obs!** För förväntat låga utbyten av NA (nukleinsyror) kan ett lågbindande provrör användas för eluering (medföljer inte).

16. Centrifugera i en mikrocentrifug med full hastighet (20,000 × g; 14,000 v/min) i 1 minut för att eluera nukleinsyror.

**Obs!** Rikta in elueringsrörets lock så att det pekar i motsatt riktning mot rotorns rotation (om t.ex. rotorn roterar medurs riktar du locket moturs).

# Klassiskt protokoll: Rening av cirkulerande nukleinsyror från 1–5 ml humanblodplasma

Detta protokoll utgör ett oförändrat protokoll från handbok för *QIAamp DSP Circulating NA Kit* version 3 (R3) för användning med bland annat befintliga användarvaliderade arbetsflöden för 1–5 ml human plasma.

## Viktigt att tänka på före start

- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Stäng av vakuemet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under protokollstegen.  
**Obs!** Vacuum Pump-trycket bör vara mellan -800 och -900 mbar.
- Balansera proverna efter rumstemperatur.
- Använd fosfatbuffrad saltlösning (PBS) till provets volym är lika med den närmaste exakta volymen (1 till 5 ml).
- Ställ in QIAvac 24 Plus enligt beskrivningen på sidan 21.
- Värm ett vattenbad eller ett värmeblock till 60 °C för användning med 50 ml centrifugrör i steg 3.
- Värm ett värmeblock till 56 °C för användning med 2 ml tvättrör i steg 14.
- Balansera QIAamp Mini-spinnkolonnerna efter rumstemperatur i minst 1 timme före användning.
- Kontrollera att Buffer ACB, Buffer ACW1 och Buffer ACW2 har förberetts (tillsättning av isopropanol eller etanol) enligt anvisningarna på sidan 26.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituerad i Buffer AVE till Buffer ACL i enlighet med anvisningarna i Tabell 4.

Tabell 4. Volym Buffer ACL och bärar-RNA (löst i Buffer AVE) som krävs för bearbetning av 1–5 ml plasmaprover av humanblod

Konfiguration för ml plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Antal prover	Buffer ACL (ml)					Bärar-RNA i Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Förfarande: Klassiskt protokoll

1. Pipettera QIAGEN Proteinase K, plasma och Buffer ACL i den ordningen i ett 50 ml centrifugrör (medföljer ej).

Konfiguration	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Stäng locket och blanda med pulsirvel-blandning i 30 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa en effektiv lysering är det viktigt att provet och Buffer ACL blandas noga för att få fram en homogen lösning.

**Obs!** Stör inte proceduren under den här tiden. Fortsätt omedelbart vidare till steg 3 för att starta lyseringsinkubationen.

3. Inkubera vid 60 °C ( $\pm 1$  °C) i 30 ( $\pm 2$ ) minuter.
4. Sätt tillbaka provröret på arbetsbänken och skruva loss korken.
5. Tillsätt Buffer ACB till lysatet i provröret. Välj volym enligt konfigurationen i steg 1.

Konfiguration	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Stäng locket och blanda noggrant med pulsirvelblandning i 30 sekunder.

Kontrollera att en synlig virvel bildas i provröret. För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att lysat och Buffer ACB blandas noga för att få fram en homogen lösning.

7. Inkubera lysat-Buffer ACB-blandningen i provröret i 5 ( $\pm 1$ ) minuter på is.

8. Sätt in QIAamp Mini-kolonnerna i VacConnector på QIAvac 24 Plus (se "Montera QIAvac 24 Plus vacuum manifold", sidan 21). Sätt in en 20 ml kolonnförlängare i den öppna QIAamp Mini-kolonnen.

Se till att kolonnförlängaren sitter stadigt insatt i QIAamp Mini-kolonnen för att undvika provläckage.

**Obs!** Spara tvättröret för torkcentrifugeringen i steg 13.

9. Applicera försiktigt lysatet från steg 7 i kolonnförlängaren på QIAamp Mini-kolonnen. Slå på vakuumpumpen och minska trycket till -800 till -900 mbar. När alla lysat har hämtats fullständigt genom kolonnerna stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar. Ta försiktigt bort kolonnförlängaren och kassera den.

Obs! Notera att stora provvolymerna av lysat (omkring 18 ml när du börjar med ett 5 ml prov) kan behöva upp till 20 minuter för att passera genom QIAamp Mini-membranet med hjälp av vakuumkraft.

En Vacuum Regulator (vakuumreglerare) kan användas om du vill frigöra vakuum snabbare och enklare (ingår i QIAvac Connecting System).

**Obs!** För att undvika korskontamination ska du undvika att korsangränsa QIAamp Mini-kolonner medan kolonnförlängare avlägsnas.

10. Tillsätt 600 µl Buffer ACW1 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW1 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
11. Tillsätt 750 µl Buffer ACW2 i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all Buffer ACW2 har hämtats fullständigt genom QIAamp Mini-kolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
12. Tillsätt 750 µl etanol (96–100 %) i QIAamp Mini-kolonnen. Låt locket på kolonnen vara öppet och slå på vakuumpumpen. När all etanol har hämtats fullständigt genom spinnkolonnen stänger du av vakuumpumpen och släpper trycket till 0 mbar.
13. Stäng locket på QIAamp Mini-kolonnen. Ta bort den från vakuumgrenröret och kassera VacConnector. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (från steg 8) och centrifugera med full hastighet (20 000 × g; 14 000 v/min) i 3 (± 0,5) minuter.

14. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör. Öppna locket och inkubera allt i 56 °C ( $\pm 1$  °C) i 10 ( $\pm 1$ ) minuter tills membranet är helt torrt.

15. Ställ QIAamp Mini-kolonnen i ett rent 1,5 ml rör för eluering (medföljer) och kassera 2 ml-tvättröret från steg 13. Tillsätt 20–150  $\mu$ l Buffer AVE mitt på QIAamp Mini-kolonnmembranet. Stäng locket och inkubera i rumstemperatur i 3 ( $\pm 0.5$ ) minuter.

**Viktigt:** Se till att Buffer AVE (elueringsbufferten) balanseras efter rumstemperatur (15–25 °C). Om elueringen görs i små volymer (<50  $\mu$ l) måste elueringsbufferten dispenserats mitt på membranet för fullständig eluering av bundna nukleinsyror.

Elueringens volymen är flexibel och kan anpassas efter kraven för nedströmstillämpningar.

Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till ett lägre totalt utbyte.

Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5  $\mu$ l mindre än elueringens volymen som tillsattes på QIAamp Mini-kolonnen.

**Obs!** För förväntat låga utbyten av NA (nukleinsyror) kan ett lågbindande provrör användas för eluering (medföljer inte).

16. Centrifugera i en mikrocentrifug med full hastighet (20,000  $\times g$ ; 14,000 v/min) i 1 minut för att eluera nukleinsyror.

**Obs!** Rikta in elueringens rörets lock så att det pekar i motsatt riktning mot rotorns rotation (om t.ex. rotorn roterar medurs riktar du locket moturs).

# Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot av QIAamp DSP Circulating NA Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

## Begränsningar

Systemprestandan för isolering av cirkulerande, cellfria nukleinsyror har beräknats med humanplasmaprover som har hämtats från följande blodprovtagningsrör:

- K2-EDTA (Beckton Dickinson and Company, Kat.nr. 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, Kat.nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, Kat.nr. 218962)

Det är användarnas ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium och inte ingår i QIAGEN:s prestandastudier.

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för nedströmstillämpningar användas. För ytterligare validering rekommenderas riktlinjerna från International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) i ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Test And Metodik rekommenderas.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

# Prestandaegenskaper

Tillämpliga prestandaegenskaper finns under resursfiken på produktsidan på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



# Referenser

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

# Felsökningshandbok

Den här felsökningshandboken kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan Vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniska supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Dessutom svarar QIAGEN teknisk service gärna på alla frågor ni har om antingen informationen och/eller protokoll i denna handbok eller analys- och provtekniker (för kontaktinformation, besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentarer och förslag på åtgärd

### Lite eller ingen nukleinsyra i eluatet

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Användning av ej stabiliserad plasma                           | Ej stabiliserade plasmaprover kan leda till snabbare DNA-nedbrytning. Vi rekommenderar att CEN/TS 16835-3:2015 följs. Upprepa reningsförfarandet med nya prover.  |
| b) | Längre tid mellan blodtagning och plasmaberedning.             | Kärnförsedda blodkroppar kan brytas ned och frigöra genomiskt DNA i plasman, vilket späder ut målnukleinsyran.  |
| c) | Proverna har frysts och tinats mer än en gång                  | Undvik att tina och frysa upprepade gånger eftersom detta kan leda till nedbrytning av DNA. Använd alltid färska prover eller prover som endast har tinats en gång.   |
| d) | Låg koncentration av mål-DNA i proverna                        | Plasmaproverna lämnades stående i rumtemperatur för länge. Upprepa reningsförfarandet med nya prover<br><b>Obs!</b> Vissa individer kan ha en låg koncentration cellfria nukleinsyror (NA) i plasman. I sådana fall bör en ökad provvolym och en låg eluerarvolym väljas. |
| e) | Ineffektiv provlysering i Buffer ACL                           | Om QIAGEN Proteinase K utsätts för förhöjd temperatur under en längre tid kan det förlora aktivitet. Upprepa proceduren med nya prover och nytt QIAGEN Proteinase K.  |
| f) | Buffer ACL-bärrar-RNA-blandningen är inte tillräckligt blandad | Blanda Buffer ACL med bärrar-RNA genom att vända provröret med Buffer ACL-bärrar-RNA försiktigt minst 10 gånger.  |
| g) | Etanol med låg procent användes istället för 96–100 %          | Upprepa reningsförfarandet med nya prover och 96–100 % etanol. Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.   |
| h) | Buffer ACB är felaktigt förberedd                              | Kontrollera att Buffer ACB-koncentratet blev rekonstituerad med rätt volym isopropanol (inte etanol, se sidan 26).  |
| i) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 är felaktigt förberedda          | Kontrollera att Buffer ACW1- och Buffer ACW2-koncentraterna späddes med rätt volym etanol (se sidan 26). Upprepa reningsförfarandet med nya prover.   |

## Kommentarer och förslag på åtgärd

- |    |   |   |
|----|---|---|
| j) | Buffer ACW1 eller Buffer ACW2 förbereddes med 70 % etanol | Kontrollera att Buffer ACW1- och Buffer ACW2-koncentraterna späddes med 96–100 % etanol (se sidan 26). Upprepa reningsförfarandet med nya prover. |
|----|---|---|

### DNA eller RNA fungerar inte bra i enzymatiska nedströmsreaktioner

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Lite eller ingen DNA i eluatet           | Se "Lite eller ingen nukleinsyra i eluatet" ovan för möjliga orsaker. Öka mängden eluat som tillsätts till reaktionen om detta är möjligt.   |
| b) | Felaktig elueringsvolym                  | Beräkna lämplig maxvolym för eluatet för din nedströmstillämpning. Minska eller öka eluatvolymen som tillsätts i nedströmstillämpningen därefter. Elueringsvolymen kan anpassas proportionerligt.<br><b>Obs!</b> Eluering med mindre volymer Buffer AVE leder till högre koncentrationer av nukleinsyror, men kan leda till ett lägre totalt utbyte. |
| c) | Buffertarna har inte blandats ordentligt | Salt- och etanolkomponenterna hos tvättbufferten Buffer ACW2 kan ha separerat efter att de har lämnats stående under en längre tid mellan körningar. Blanda alltid buffertarna noggrant inför varje körning.   |
| d) | Störningar på grund av bärar-RNA         | Om förekomsten av bärar-RNA i eluatet stör de enzymatiska nedströmstillämpningarna kan det vara nödvändigt att minska mängden bärar-RNA eller ta bort det helt och hållet.   |

### Allmän hantering

- |    |                              |   |
|----|------------------------------|---|
| a) | Blockerad QIAamp Mini-kolonn | Om flödes hastigheten minskar kan vakuuttiden förlängas.<br>Alternativt kan du stänga VacValve, om den används, och försiktigt ta bort montage med kolonnförlängaren, VacConnector och VacValve från QIAamp Mini-kolonnen utan att förlora något lysat i kolonnförlängaren.<br>Ta bort QIAamp Mini-kolonnen från vakuumprenröret, ställ den i ett 2 ml tvättrör och centrifugera den med full hastighet tills provet helt har passerat genom membranet. Sätt tillbaka montage med kolonnförlängaren, VacConnector och VacValve som innehåller det kvarvarande lysatet. Slå på vakuumpumpen, öppna VacValve och fortsätt att tillsätta det kvarvarande lysatet.<br>Upprepa ovanstående procedur om QIAamp Mini-kolonnen fortsätter att blockeras.<br>kryoprecipitater kan ha bildats i plasman på grund av upprepad frysning och upptining. Dessa kan blockera QIAamp Mini-kolonnen. Använd inte plasma som har frysts och tinats mer än en gång.<br>Om kryoprecipitater är synliga, kan provet rengöras genom att man centrifugerar det i 5 minuter med 16 000 x g. |
| b) | Varierande elueringsvolym    | Olika prover kan påverka volymen hos det färdiga eluatet. Eluatvolymutbytet kan vara upp till 5 µl mindre än elueringsvolymen som tillsattes på QIAamp Mini-kolonnen.   |

## Kommentarer och förslag på åtgärd

---

- c) Vakuumtryck på -800 till -900 mbar uppnåddes inte

Vakuimgrenröret sluter inte tätt. Tryck på locket på vakuimgrenröret när vakuumpumpen är på. Kontrollera om vakuumtrycket uppnås.

Packningen i QIAvac-locket är utsliten. Kontrollera grenrörets försegling manuellt och byt ut den vid behov.








VacValves är utslitna. Ta bort alla VacValves och sätt in VacConnectors direkt i luerförlängningarna. Sätt in QIAamp Mini-kolonner i VacConnectors, stäng kolonnernas lock och slå på vakuumpumpen. Kontrollera om vakuumtrycket uppnås. Byt ut VacValves vid behov.

Anslutningen till vakuumpumpen läcker. Stäng alla luerförlängningar med luerlock och slå på vakuumpumpen. Kontrollera att vakuumtrycket är stabilt efter att pumpen har slagits på (och Vacuum Regulator-ventilen är stängd). Byt ut anslutningarna mellan pumpen och vakuimgrenröret vid behov.

Om vakuumtrycket fortfarande inte uppnås bör vakuumpumpen ersättas med en starkare pump.




# Symboler

Nedanstående symboler finns i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Partinummer
	Materialnummer (dvs. komponentetikett)
	Komponenter
	Innehåller
	Antal

## Symbol

## Symbolförklaring

	GSI-artikelnummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Läs bruksanvisningen innan användning
	Utsätt inte för direkt solljus
	Varning/försiktighet
	Vid ankomst
	Öppna vid leverans. Förvara QIAamp Mini-spinnkolonnerna vid 2–8 °C
	Volym
	Tillsätta

## Symbol

## Symbolförklaring



Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av etanol i flaskan

\_\_\_\_\_

**EtOH**

Etanol



Skriv ner aktuellt datum efter tillsats av isopropanol i flaskan

\_\_\_\_\_

**IPA**

Isopropanol

→

Leder till

**GITC**

Guanidintiocyanat

**GuHCl**

Guanidinhydroklorid

**BRIJ 58**

BRIJ 58

**PROTK**

Proteinas K

**UDI**

Unik enhetsidentifierare

# Bilaga A: Rekommendation för separation och förvaring av blodplasma

För stabilisering av provtagningsrör för blod ( t.ex. PAXgene ccfDNA Tube eller Streck Cell-Free DNA Tube) ska tillverkarnas anvisningar för separation och förvaring av plasma efterföljas. Vi rekommenderar att du validerar dessa förvaringsvillkor tillsammans med din specifika nedströmstillämpning och mål.

För icke-stabiliserande BCT, rekommenderar vi att man följer ISO 20186-3:2019 Molekylära in vitro diagnostiska undersökningar — Specifikationer angående förundersökande processer för venöst helblod — Del 3: Isolerat cirkulerande cellfritt DNA från plasma eller CEN/TS 17742 Molekylära in vitro diagnostiska undersökningar — Specifikationer angående förundersökande processer för venöst helblod — Isolerat cirkulerande cellfritt RNA från plasma.

För att isolera cirkulerande, cellfria nukleinsyror från blodprover, rekommenderar vi att man följer detta protokoll, vilket omfattar ett centrifugeringssteg med höga g-krafter för att avlägsna cellulärt skräp och därmed minska mängden cellulärt eller genomiskt DNA och RNA i provet.

1. Placera EDTA-helblod i BD Vacutainer®-provör (eller andra primärblodprovör med EDTA som antikoagulant) i en centrifug som har kylts till 4 °C med en swing-out-rotor och lämpliga bägare.
2. Centrifugera blodproverna i 10 min. med 1900 x g (3000 v/min.) i 4 °C.
3. Aspirera plasmasupernatanten försiktigt utan att störa plasma-cell-gränslagret. Cirka 4–5 ml plasma kan utvinnas från ett 10 ml primärt blodprovör.

**Obs!** Plasma kan nu användas för utvinning av cirkulerande nukleinsyror. Den följande höghastighetscentrifugeringen kommer dock att ta bort ytterligare celldebris och föreningar från de cirkulerande nukleinsyrorna genom genomiskt DNA och RNA som härleds från skadade kärnförsedda blodkroppar.



4. Aspirerad plasma överförs till ett nytt centrifugrör.
5. Centrifugera plasmaproverna i 10 minuter med 16 000 x g (i en fastvinklad rotor) i 4 °C.

Detta avlägsnar ytterligare cell-nukleinsyror som sitter fast i celldebris.

6. Avlägsna supernatanten försiktigt och överför den till ett nytt provrör utan att störa pelletten.
7. Om plasma kommer att användas för utvinning av nukleinsyror samma dag ska den förvaras vid 2– 8 °C till att den ska bearbetas. För längre förvaring kan plasmadelmängder från såväl stabiliserade som icke-stabiliserade blodprovtagningsrör förvaras i –20 °C (DNA som mål) eller –80 °C (RNA som mål) i minst 4 veckor. Innan plasman används för utvinning av cirkulerande nukleinsyror ska plasmaprovrören tinas i rumstemperatur.
8. **Valfritt:** Centrifugera plasmaproverna i 5 minuter vid 16 000 x g (i en fastvinklad rotor) för att ta bort kryoprecipitater

**Valfritt:** Överför supernatant till ett nytt provrör och påbörja sedan ett protokoll för utvinning av cirkulerande nukleinsyror.

# Bilaga B: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering

## Arbeta med RNA

Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboratoriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminering inte eliminerats först. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter reningsproceduren. För att skapa och upprätthålla en RNase-fri omgivning bör följande försiktighetsåtgärder vidtas vid förbehandling och bruk av engångs- och flegångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

## Allmän hantering

Arbetet med RNA ska alltid följa principerna för korrekt mikrobiologisk aseptisk teknik. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontaminering. För att undvika RNase-kontaminering via huden eller genom dammiga laboratorieinstrument, bör du därför alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prover. Byt laboratoriehandskarna ofta och stäng alltid alla rör direkt efter användning. Låt renat RNA ligga kvar på is, om delmängder pipetteras för nedströmstillämpningar.

## Plastvaror för engångsbruk

Användning av sterila, RNase-fria polypropylenprovror för engångsbruk rekommenderas för hela proceduren.

# Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	För 50 beredningar: QIAamp Mini-kolonner, kolonnförlängare, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagens, buffertar och provtagningsrör	61504
Tillbehör		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold *	Vakuumbgrenrör för bearbetning av 1–24 spinnkolonner: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, luerlock och snabbkopplingar	19413
Vacuum Pump*	Universalvakuumpump	84010 [USA och Kanada] 84000 [Japan] 84020 [övriga världen]
QIAvac Connecting System*	System för att ansluta vakuumbgrenrör till vakuumpump: innehåller bricka, avfallsflaskor, slangar, kopplingar, ventil, mätenhet och 24 VacValves	19419

\* För användning med vakuumprotokoll.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kit handbok eller bruksanvisning. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satsen finns tillgängliga på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

# Dokumentrevisioner

Revision	Beskrivning
R1, juni 2022	IVDR-Kit Version 2 utgåva, inga ändringar av protokoll eller prestandadata jämfört med Kit Version 1; tillägg av "manuell" isolering vid avsedd användning; mindre uppdateringar och korrigeringar

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

### Begränsat licensavtal för QIAamp DSP Circulating NA Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och denna handbok och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, denna handbok och ytterligare protokoll som finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Vissa av dessa ytterligare protokoll har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. Dessa protokoll har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, än de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varumärken: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, (QIAGEN Group); Agilent<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc.); BD<sup>™</sup>, Vacutainer<sup>®</sup> (Becton Dickinson and Company); PAXgene<sup>®</sup> (PreAnalytiX GmbH); Tween<sup>™</sup> (ICI Americas Inc.). Registrerade namn, varumärken osv. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag.

Juni-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Webbplats [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)